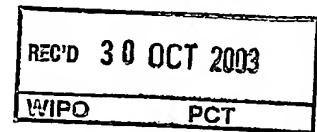


PCT/EP 03/09923

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 43 303.8

Anmeldetag: 13. September 2002

Anmelder/Inhaber: Professor Dr.rer.nat. Alfred Nordheim,
Tübingen/DE;
Dr. Winfried Kammerr, Tübingen/DE;
Stefanie Weiß, Tübingen/DE;
Giang Lam Vuong, Tübingen/DE.

Bezeichnung: Verfahren zur Detektion von Biomolekülen

IPC: G 01 N 27/453

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Ebert:



Patentanwälte Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster & Partner
European Patent, Design and Trademark Attorneys

Kronenstraße 30 Fon +49 (0)711 222 976-0
D-70174 Stuttgart +49 (0)711 228 11-0
Deutschland/Germany Fax +49 (0)711 222 976-76
 +49 (0)711 228 11-22
 e-mail mail@kronenpat.de
 www.kronenpat.de

Anmelder: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Nordheim
 Dr. Winfried Kammer
 Stefanie Weiß
 Giang Lam Vuong
 Auf der Morgenstelle 15

 72076 Tübingen

Unser Zeichen: P 41 238 DE

13. September 2002
TM/CW/nw

Beschreibung

Verfahren zur Detektion von Biomolekülen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Biomolekülen mittels einer Metallverbindung in Gegenwart mindestens eines mindestens bifunktionellen Agenses.

- 10 Die Detektion und Charakterisierung von Biomolekülen ist von fundamentaler Bedeutung für die biologische Forschung und die klinische Medizin. Insbesondere bei der Suche nach Mutationseignissen sowie bei der Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen werden regelmäßig Detektions- und Charakterisierungsverfahren für unterschiedliche
- 15 Biomoleküle eingesetzt.

Als Biomoleküle wird hier insbesondere die Gruppe, bestehend aus Peptiden, Proteinen, Glycoproteinen, Proteoglykanen, Kohlehydraten und Nukleinsäuren, verstanden.

- 20 Für den ersten Schritt der Detektion, die Auftrennung dieser Moleküle, werden derzeit zumeist ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese-Systeme eingesetzt. Elektrophorese bedeutet eine Auftrennung gelade-

ner Teilchen durch Einfluss eines elektrischen Feldes. Für die Elektrophorese können verschiedene Trägermaterialien eingesetzt werden, unter anderem Agarose-Gele, Zelluloseacetatgele oder Polyacrylamidgele. Aufgrund der im Vergleich zu Agarosegelen höheren Trennwirkung werden für die Proteincharakterisierung bevorzugt Polyacrylamidgele eingesetzt. Nach abgeschlossener gelelektrophoretischer Trennung müssen die Biomoleküle auf dem Trägermaterial sichtbar gemacht werden. Hierfür existieren verschiedene Visualisierungstechniken wie z. B. die Coomassie-Blau Färbung, Fluoreszenzmarkierung, radioaktive Markierung, Ethidiumbromidfärbung und Silberfärbung. Bei allen aufgeführten Methoden existieren große Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität, des zeitlichen und materiellen Aufwandes, wie auch der Umweltverträglichkeit und Gesundheitsschädlichkeit der verwendeten Reagenzien bzw. der entstehenden Abfälle. So ist z. B. die Coomassie-Blau-Färbung sehr einfach durchzuführen, besitzt dafür allerdings eine sehr geringe Sensitivität. Vor allem bei der radioaktiven Markierung oder der Ethidiumbromidfärbung entstehen unerwünschte radioaktive bzw. kanzerogene Abfälle. Die Fluoreszenzmarkierung besitzt den Nachteil eines relativ großen apparativen Aufwandes. Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Blau Färbung ca. einhundertfach sensitiver, es entstehen keine radioaktiven oder kanzerogenen Abfälle und der instrumentelle Aufwand ist relativ gering. Daher ist die Silberfärbung die derzeit am häufigsten eingesetzte Färbemethode zur Visualisierung von Proteinen. Die Silberfärbung besitzt jedoch den entscheidenden Nachteil, daß sie bei entsprechender erwünschter Sensitivität sehr zeitaufwendig ist. Dies ist jedoch vor allem in der modernen medizinischen Diagnostik und Life-Science-Forschung ein entscheidender Nachteil.

Die verschiedenen Silberfärbemethoden lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen, je nach verwendeter Silberverbindung, einteilen. Man unterscheidet zwischen Silbernitratfärbung und Silberdiaminfärbung. Näheres hierzu siehe Electrophoresis 13, 429-439 (1992) von T. Rabilloud.

Ein weiterer Unterschied zwischen den unterschiedlichen Visualisierungstechniken sowie innerhalb der verschiedenen Variationen der Silberfärbung besteht in der Verfügbarkeit der Moleküle für weitere Charakterisierungsmethoden, insbesondere die massenspektrometrische Untersuchung. Bei vielen Visualisierungsmethoden bzw. bisherigen Silberfärbungen liegt das Molekül nach der Detektion in einer chemisch veränderten Form vor und steht daher einer massenspektrometrischen Untersuchung nicht mehr oder nur in einer für die Charakterisierung unzureichenden Form zur Verfügung.

Unabhängig von der exakten Färbemethode und der Verfahrensführung ist den meisten Silberfärbungen die Abfolge der Schritte Fixierung, Sensitivierung, Silberschritt (Inkubation mit einer Lösung, die Silberionen enthält), Entwickeln und Stoppen der Reaktion gemeinsam.

Zur Fixierung der Moleküle werden die Gele zunächst mit einer sauren alkoholischen Lösung inkubiert. Anschließend wird ein Sensitivierungsschritt durchgeführt, in welchem die Gele mit Reduktionsmitteln wie Glutaraldehyd, DTT, Dithionit oder Thiosulfat inkubiert werden. Diese sind für die Reduktion von Silberionen an der Oberfläche der Biomoleküle zu kleinsten Mengen an metallischem Silber verantwortlich und dienen im Entwicklungsschritt als Keimzelle für weiteren Niederschlag an Silber (Näheres hierzu siehe in Electrophoresis 11, 785-794 (1990) von T. Rabilloud). Nach einem Waschschrift, bei dem überschüssiges Reduktionsmittel entfernt wird, findet die Silberfärbung/Silberimprägnierung des Gels mittels Silbernitrat- bzw. Silberdiaminlösung statt. Nach diesem Silberschritt wird das Gel erneut gewaschen und anschließend mit einer Entwicklungslösung, die, entweder Formaldehyd und Natriumcarbonat oder Formaldehyd und Zitronensäure enthält, entwickelt. Nach abgeschlossener Entwicklung wird das Gel in einer Stopplösung inkubiert, um den Entwicklungsvorgang abzustoppen. Stopplösung

gen enthalten in der Regel Tris/Essigsäure, Zitronensäure oder Komplexbildner, wie beispielsweise EDTA oder EGTA.

Alle derzeit bekannten Methoden besitzen entweder den Nachteil, daß sie mit > 5 bis 24 h Silberfärbedauer sehr langwierig sind, um dabei eine relativ hohe Sensitivität zu erreichen, oder sie sind von vergleichsweise kurzer Dauer, d. h. < 5 h, aber dabei weniger sensitiv. Außerdem existieren relativ sensitive Silberfärbemethoden, die jedoch keine zufriedenstellende massenspektrometrische Untersuchung der Biomoleküle im Anschluss an die Detektion zulassen.

Wesentliches Ziel der Erfindung ist es, ein schnelles und gleichzeitig sehr sensitives Silberfärbeverfahren zu entwickeln, welches eine, sich an die Detektion anschließende, massenspektrometrische Charakterisierung der Biomoleküle zulässt.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Detektionsverfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und den Kit mit den Merkmalen des Anspruchs 22 gelöst. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 21 sowie 23 und 24 dargestellt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Erfindungsgemäß wird bei einem Verfahren zur Detektion von Biomolekülen, insbesondere von Peptiden, Proteinen, Glycoproteinen, Proteoglycanen, Kohlehydraten und/oder Nukleinsäuren, mittels einer Metallverbindung ein bifunktionelles Agens eingesetzt, welches einen hydrophoben und einen reduzierenden Teil besitzt. Es ist auch möglich, daß das Agens mehr als einen hydrophoben Teil und/oder mehr als einen reduzierenden Teil besitzt. Es ist ebenfalls denkbar, mehr als ein mindestens bifunktionelles Agens zur Detektion einzusetzen.

Gemäß der Erfindung handelt es sich bei dem bifunktionellen Agens um ein Molekül der allgemeinen Form X-R, wobei es sich bei dem Teil X des bifunktionellen Agens vorzugsweise um den reduzierenden Teil handelt.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Teil X insbesondere um einen linearen oder homo- und/oder heterozyklischen Kohlenwasserstoff.

- 10 Der Teil X besitzt vorzugsweise mindestens eine Hydroxylgruppe, mindestens eine Sulfhydrylgruppe, mindestens eine Carbonylgruppe, mindestens eine Thiosulfatgruppe und/oder mindestens eine ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung.

- 15 In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei X um ein Molekül mit antioxidativen Eigenschaften, vorzugsweise um ein Vitamin, insbesondere aus der Gruppe Vitamin A, Vitamin C und/oder Vitamin E. In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Teil X des biofunktionellen Agenses um Ascorbinsäure.

- 20 Gemäß der Erfindung handelt es sich bei R um den hydrophoben Teil des bifunktionellen Agens.

- 25 In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei R um einen gesättigten Kohlenwasserstoff. Es ist auch denkbar, daß es sich bei R um einen mindestens einfach ungesättigten Kohlenwasserstoff handelt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei R um einen Acyloxi-Rest der allgemeinen Form $-O-CO-C_nH_{(2n+1)}$, wobei n vorzugsweise 8 - 21, insbesondere 11 - 17 und insbesondere bevorzugt 15, ist.

In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem bifunktionellen Agens um Ascorbylpalmitat. Es ist jedoch auch denkbar, daß es sich um Ascorbylstearat, Ascorbylmyristat oder Ascorbyllaurat handelt.

- 5 Gemäß der Erfindung kann das bifunktionelle Agens während der Detektion in einer Endkonzentration von 10^{-5} bis 1 %, vorzugsweise von 10^{-4} bis 0,1 %, insbesondere 5×10^{-4} bis 5×10^{-3} %, vorliegen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt die Endkonzentration des bifunktionellen Agens 10^{-3} %.

10

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Metallverbindung um eine Silberverbindung, insbesondere um Silbernitrat. In einer anderen Ausführungsform kann es sich bei der Silberverbindung auch um ein Silberdiamin handeln.

15

Bei den zu detektierenden Nukleinsäuren handelt es sich vorzugsweise um DNA oder RNA.

- 20 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die zu detektierenden Moleküle für die Detektion auf oder in einem Träger angebracht. Im Falle von Proteinen handelt es sich bei dem Träger vorzugsweise um ein Polyacrylamidgel. Im Falle von DNA handelt es sich bei dem Träger vorzugsweise um Agarosegele. Im Falle von RNA ist je nach Größe der RNA-Fragmente die Verwendung von Agarosege-
- 25 len oder von Polyacrylamidgelen denkbar. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Trägermaterial um eine Membran, insbesondere eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran. Es ist auch denkbar, daß es sich bei dem Träger um einen Microarray-Träger, insbesondere um einen Biochip, handelt. Das erfindungsgemäße Verfahren
- 30 kann auch zum Färben von Proteinen aus Zellen, welche mittels LCM (laser capture microdissection) aus einem Gewebe herausgelöst wurden, eingesetzt werden.

Gemäß der Erfindung umfasst das Verfahren zur Detektion der Biomoleküle mindestens die folgenden Schritte: Zunächst werden die Moleküle durch Inkubieren mit einer Fixierlösung auf oder in dem Träger fixiert, anschließend wird der Träger mit den Molekülen in mindestens einem
5 Waschschrift mit einer ersten Waschlösung und anschließend mit einer zweiten Waschlösung gewaschen. Im anschließenden Metallverbindungsschritt wird das Trägermaterial mit den darauf oder darin fixierten Molekülen mit einer Lösung der Metallverbindung inkubiert und im anschließendem Waschschrift mit reinstem Wasser gewaschen. Hieran
10 schließt sich der Entwicklungsschritt mit einer Entwicklungslösung und der abschließende Stopschritt an.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das bifunktionelle Agens im Fixierschritt, insbesondere als Zusatz zur Fixierlösung, eingesetzt
15 werden. Die Fixierlösung kann neben dem bifunktionellen Agens 20 - 50 %, insbesondere 40 %, Ethanol enthalten.

Gemäß einer Ausführungsform wird das bifunktionelle Agens in einer mindestens teilweise alkoholischen Lösung eingesetzt. Vorzugsweise
20 handelt es sich bei der alkoholischen Lösung um eine ethanolische Lösung, insbesondere aus absolutem Ethanol.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann im Entwicklungsschritt ein Komplexbildner, insbesondere EDTA, als Bestandteil der Entwicklungs-
25 lösung eingesetzt werden. In einer anderen Ausführungsform kann als Komplexbildner auch EGTA verwendet werden.

Als weitere Bestandteile kann die Entwicklungslösung neben dem Komplexbildner auch Natriumcarbonat, Natriumthiosulfat und/oder ein redu-
30 zierendes Reagens, vorzugsweise aus der Gruppe der Aldehyde, enthalten. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem reduzierenden Reagens um Formaldehyd.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann nach der Detektion der Biomoleküle eine weitere Charakterisierung, vorzugsweise eine massenspektrometrische Untersuchung, insbesondere eine Identifizierung der Biomoleküle mittels MALDI-MS oder mit ESI-MS, durchgeführt werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin einen Kit zur Detektion von Biomolekülen, welcher mindestens ein mindestens bifunktionelles Agens enthält. Das im Kit enthaltene bifunktionelle Agens besitzt mindestens einen hydrophoben und mindestens einen reduzierenden Teil. Das bifunktionelle Agens liegt in einer Ausführungsform des Kits in der Fixierlösung vor.. Der erfindungsgemäße Kit umfasst weiterhin mindestens eines der sich auf das bifunktionelle Agens beziehenden Merkmale der Patentansprüche 2 bis 11, wie sie oben bereits erläutert wurden.

Der Kit umfasst außerdem das Merkmal des sich auf den Entwicklungsschritt beziehenden Anspruchs 19. Auf diese Erläuterung wird nunmehr im Zusammenhang mit dem Kit ausdrücklich Bezug genommen und verwiesen.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren durch ausführliche Beschreibung von besonderen Ausführungsformen sowie durch Figuren erläutert. In diesen Ausführungsformen können einzelne Merkmale der Erfindung allein oder in Kombination mit anderen Merkmalen verwirklicht sein. Die beschriebenen besonderen Ausführungsformen dienen lediglich zur Erläuterung und zum besseren Verständnis der Erfindung und sind in keiner Weise einschränkend zu verstehen.

Im übrigen ist die Erfindung anhand der Figuren dargestellt; dabei bedeuten:

Figur 1 zeigt die Sensitivität der Proteinfärbemethoden.

Figur 2 zeigt ausgewählte Proteinspots für die massenspektrometrische Identifizierung am Beispiel eines mit kolloidalem Coomassie gefärbten 2D-Gels. Bei den anderen Färbungen wurden die korrespondierenden Spots für die MS-Identifizierung ausgewählt.

Figur 3 zeigt die MALDI-MS Sequenzabdeckung in %.

10 Figur 4 (bestehend aus den Teilen 4A, 4B, und 4C) zeigt die Protein-identifizierung mit ESI-MS nach tryptischem Verdau dargestellt in einer Tabelle bestehend aus den Teilen A, B und C.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt die unterschiedlichen Sensitivitäten der Proteinfärbung für die drei bekannten Proteinfärbemethoden nach Hochstrasser (siehe experimenteller Teil), Amersham Biosciences Plus One Silver Staining Kit (#17-1150-01) und dem Fluoreszenzfärbeverfahren SYPRO Ruby von Bio-Rad (# 170-3125), sowie das erfindungsgemäße neue Färbeverfahren. Das neue Verfahren zur Detektion von Biomolekülen ist mindestens um den Faktor 30 sensitiver als die bisher bekannten Methoden nach Hochstrasser und Amersham Biosciences und darüber hinaus deutlich sensitiver als die Markierung durch einen Fluoreszenzfarbstoff nach der Methode mit SYPRO Ruby. Die konventionellen Silberfärbemethoden, beispielsweise die Methode nach Hochstrasser oder Amersham Biosciences, besitzen zumeist den Nachteil, daß sie aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd als Sensitivierungsmittel im Sensitivierungsschritt die zu detektierenden Biomoleküle nach der Detektion einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung nicht mehr oder nur unzureichend zugänglich sind. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Biomolekülen verwendet jedoch anstelle des Glutaraldehyds ein bifunktionelles Molekül, welches nicht die Nachteile des Glutaraldehyds besitzt und die Identifizierung der Biomoleküle durch Massenspektrometrie nach der Detektion ermöglicht. Zum Beweis dafür, daß Proteine nach erfolgter Detektion mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrensmittels massenspektrometrischer Methoden identifiziert werden können, wurde ein vergleichendes Experiment durchgeführt. Die in Figur 2 markierten 15 Proteinspots wurden aus vier 2-D-Gelen ausgewählt, die parallel mit vier unterschiedlichen Färbemethoden eingefärbt wurden. Bei den vier Färbemethoden handelte es sich erstens um die klassische kolloidale Coomassie-(G250)-Färbung, die als massenspektrometrie kompatibel bekannt ist. Bei der zweiten Methode handelt es sich um die erfindungsgemäße Silberfärbemethode, welche im experimentellen Teil näher beschrieben ist. Bei der dritten Methode

handelt es sich um die Färbung nach Hochstrasser unter Verwendung von Glutaraldehyd. Bei der vierten Methode handelt es sich um die Färbung mit dem Plus One Silver Staining Kit von Amersham Biosciences, ebenfalls unter Verwendung von Glutaraldehyd.

5

Im Anschluss an die unterschiedlichen Färbeverfahren wurden die einzelnen Proteinspots extrahiert und anschließend sowohl mittels MALDI-MS und ESI-MS untersucht. Die Ergebnisse dieser Proteinidentifizierungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

10

Figur 3 zeigt für die Spots Nr. 1 bis Nr. 15 die Sequenzabdeckung nach einer MALDI-MS in Prozent für die vier unterschiedlichen Proteinfärbemethoden. Es wurde die durchschnittliche Sequenzabdeckung für jede Methode bestimmt. Werte in Klammern wurden bei der Durchschnittsbil-

15

dung nicht einbezogen, da die gefundenen Peptidmassen von verschiedenen Isoformen eines Proteins stammen könnten und so kein eindeutiger Wert für die Sequenzabdeckung bestimmbar ist. Bei dieser massenspektrometrischen Bestimmung erwies sich die erfindungsgemäße Silberfärbemethode mit 19 % Sequenzabdeckung sogar der klassischen

20

Färbung mit kolloidalem Coomassie (17,1 % Sequenzabdeckung) als überlegen. Dies zeigt deutlich die Eignung des erfindungsgemäßen Detektionsverfahrens für eine im Anschluss an die Detektion durchgeführte massenspektrometrische Identifizierung der Biomoleküle. Die Ergebnisse der beiden Färbemethoden nach Hochstrasser (6,3 % Sequenzab-

25

deckung) und der Färbung mittels des Kits von Amersham Biosciences (9 % Sequenzabdeckung) zeigen deutlich eine Beeinträchtigung der Identifizierbarkeit, durch, die auf die Verwendung von Glutaraldehyd zurückgeführt werden kann. Die insgesamt sehr niedrigen Sequenzabdeckungswerte resultieren aus den geringen Proteinmengen, welche für

30

dieses vergleichende Experiment eingesetzt wurden.

Figur 4 zeigt eine Darstellung der wiedergefundenen Aminosäuren von
ausgewählten Peptiden aus den einzelnen Proteinspots und die Ermitt-
lung der Sequenzabdeckung. Auch die Detektion mittels ESI-MS zeigt
deutlich die Eignung des erfindungsgemäßen Detektionsverfahrens im
5 Vergleich zur Methode nach Hochstrasser oder Amersham Biosciences.
Die Sequenzabdeckung der neuen Silberfärbemethode betrug ebenso
wie die der kolloidalen Coomassiefärbung 67 %, im Gegensatz zu 35 %
bei den beiden anderen Methoden (Hochstrasser und Amersham Bios-
ciences).

10

Experimenteller Teil

Das für die unterschiedlichen Färbungen verwendete Proteingemisch wurde auf folgende Weise aus murinen embryonalen Stammzellen erhalten: 10 Mio. Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert und das Pellet anschließend mit einem Lysepuffer, bestehend aus 9 M Harnstoff, 4 % CHAPS (Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfonat), 1 % DTT (Dithio-threitol), 1 % Pharmalyte (pH 3-10) und 0,001 % Bromphenolblau lysiert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach Bradford [Bradford, M. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254, 1976] bestimmt.

Silberfärbung von Biomolekülen:

15

1. Erfindungsgemäße Methode

Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich in den Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschritten kann durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreicht werden.

25 1. Schritt: Fixieren der Biomoleküle

Das Polyacrylamidgel mit den darin befindlichen Biomolekülen wird in eine Fixierlösung, bestehend aus 40 %igem Ethanol sowie 10^{-3} % Ascorbylpalmitat, gegeben. Die Zugabe des Ascorbylpalmitats erfolgte in Form einer Lösung des Ascorbylpalmitats in absolutem Ethanol. Die Dauer der Fixierung beträgt 30 Minuten.

2. Waschschritte:

Die Gele werden zuerst mit einer 20 %igen und anschließend mit einer 10 %igen EthanolLösung gewaschen. Die Dauer beträgt jeweils 15 Minuten.

5

3. Silberschritt:

Nach Entfernen der Waschlösung werden die Gele in einer 0,5 %igen SilbernitratLösung für 30 Minuten inkubiert

10 4. Waschschritt:

Nach Entfernen der SilberLösung werden die Gele für 5 Minuten mit Milli-Q-Wasser gewaschen.

5. Entwicklung:

15 Die Waschlösung wird entfernt und die Gele werden mit der Entwicklungslösung für ca. 10-20 Minuten entwickelt, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht ist. Die Entwicklungslösung besteht pro Liter aus 1,4 % Natriumcarbonat, 0,06 % EDTA, 240 µl 10 % Natriumthiosulfat-Lösung sowie 800 µl 37 %ige Formaldehydlösung.

20

6. Stoppen der Färbung:

Im Anschluss an die Entwicklung wird die Entwicklungslösung entfernt und durch eine Stopplösung ersetzt, welche aus 1,5 % EDTA-Lösung oder aus einer Lösung, bestehend aus 5 % Tris-Base und 2 % Essigsäure, gelegt. Die Dauer des Stoppschrittes beträgt 5 Minuten.

25

2. Färbemethode nach Hochstrasser

30 Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich auf Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschrit-

ten kann man z. B. durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen, oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreichen

- 5 1. Fixierer 1 (40 % Ethanol + 10 % Essigsäure)
Dauer der Fixierung: 1 h
- 10 2. Fixierer 2 (5% Ethanol + 5 % Essigsäure)
Dauer der Fixierung: 2 h oder über Nacht
- 15 3. Waschschrift mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 5 Minuten
- 15 4. Fixierer 3 (74 g Natriumacetat-Trihydrat pro Liter + 20 ml 50 %
Glutaraldehyd pro Liter)
Dauer der Fixierung: 30 Minuten
- 20 5. 3 Waschschriffe mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 3 mal 10 Minuten
- 20 6. Inkubation der Gele in Naphthalin-2,6-disulfonsäure
Dauer: 30 Minuten
- 25 7. Inkubation der Gele in Naphthalin-2,6-disulfonsäure
Dauer: 30 Minuten
- 25 8. 4 Waschschriffe mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 4 mal 15 Minuten
- 30 9. Silberschrift
Nach Entfernung der Waschlösung (Milli-Q-Wasser) werden die
Gele für 30 Minuten in einer Silberdiaminlösung inkubiert.

Die Silberdiaminlösung besteht aus 8 g Silbernitrat pro Liter, 13,3 ml 25 % Ammoniak und 4 ml 5 M NaOH.

10. 4 Waschritte mit Milli-Q-Wasser
5 Dauer: 4 mal 4 Minuten

11. Entwicklungsschritt
Die Waschlösung wird entfernt und die Gele werden mit der Entwicklerlösung für die Dauer von 5-10 min. entwickelt.
10 Die Entwicklungslösung besteht aus 100 mg Zitronensäure und 1 ml 37 % Formaldehyd pro Liter

12. Stopschritt
Die Entwicklerlösung wird entfernt und durch eine Stopplösung ersetzt.
15 Die Stopplösung besteht aus 50 g Tris-Base mit 20 ml Essigsäure.
Dauer: 5-10 Minuten

20 3. Amersham Biosciences Kit

Es wurde der Plus One Silver Stain Kit (Protein) verwendet und die Detektion entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

25

4. SYPRO Ruby

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde der Kit SYPRO Ruby von Bio-Rad (# 170-3125) verwendet und die Detektion entsprechend dem Herstellerprotokoll mit einem Imagingsystem der Fa. Raytest (Fuji FLA 2000) durchgeführt.

30

5. Kolloidales Coomassie

Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich in Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschritten kann man z. B. durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreichen

10 Die kolloidale Coomassie-Lösung besteht aus:

2 g Coomassie G250 in 1 l Milli-Q-Wasser gelöst + 55,5 ml 95-97 % Schwefelsäure. Die Lösung wird über Nacht gerührt und anschließend durch einen Filter filtriert. Anschließend werden 220 ml 10 M NaOH und 310 ml 100 % Trichloressigsäure zugegeben.

15

1. Fixierung und Färbung der Gele mit der Kolloidalem Coomassie Lösung

Dauer: über Nacht

20 2. Waschschritt mit Milli-Q-Wasser

Die Färbelösung wird entfernt und mehrmals mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Der Waschschritt wird solange durchgeführt, bis der Gelhintergrund auf ein Minimum reduziert ist.

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Molekülen, insbesondere von Pepti-
den, Proteinen, Kohlehydraten, Glycoproteinen, Proteoglykanen
und/oder Nukleinsäuren mittels einer Metallverbindung in Gegen-
wart mindestens eines mindestens bifunktionellen Agens, wobei
das Agens mindestens einen hydrophoben Teil und mindestens
einen reduzierenden Teil besitzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich
bei dem bifunktionellen Agens um ein Molekül der allgemeinen
Form X-R handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
es sich bei X um den reduzierenden Teil handelt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß es sich bei X um einen linearen oder homo-
und/oder heterozyklischen Kohlenwasserstoff handelt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß X vorzugsweise mindestens eine Hydroxyl-
Gruppe, mindestens eine Sulfhydryl-Gruppe, mindestens eine
Carbonyl-Gruppe, mindestens eine Thiosulfat-Gruppe und/oder
mindestens eine ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung ent-
hält.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß es sich bei X um ein Molekül mit antioxidati-
ven Eigenschaften, beispielsweise um ein Vitamin, vorzugsweise

aus der Gruppe Vitamin A, Vitamin C und/oder Vitamin E, insbesondere um Ascorbinsäure, handelt.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um den hydrophoben Teil handelt.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um einen gesättigten oder mindestens einfach ungesättigten Kohlenwasserstoff, vorzugsweise um einen Acyloxy-, Acyl- und/oder Alkyl-Rest handelt.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um den Acyloxy-Rest der allgemeinen Form $-O-CO-C_nH_{(2n+1)}$ mit $n = 8-21$, bevorzugt $n = 11-17$, insbesondere $n = 15$, handelt.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem bifunktionellen Agens um Ascorbylpalmitat (= Palmitoylasorbinsäure), Ascorbylstearat (= Stearoylasorbinsäure), Ascorbylmyristat (Myristoylasorbinsäure) oder Ascorbyllaurat (Lauroylasorbinsäure) handelt.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens während der Detektion in einer Endkonzentration von 10^{-5} bis 1 % (w/v), bevorzugt von 10^{-4} bis 0,1 % (w/v), insbesondere $5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ (w/v) und bevorzugt 10^{-3} % (w/v), vorliegt.
- 30 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Metallverbindung um eine Silberverbindung, bevorzugt Silbernitrat, handelt.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Nukleinsäuren um DNA oder RNA handelt.
- 5 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Moleküle für die Detektion auf und/oder in einem Träger angebracht werden.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Träger um ein Gel, insbesondere ein Polyacrylamid- oder Agarose-Gel, um eine Membran, insbesondere eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran und/oder um einen Microarray-Träger, insbesondere einen Biochip, handelt.
- 15 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion der, insbesondere auf oder in dem Träger befindlichen, Moleküle mindestens folgende Schritte umfasst: Fixier-Schritt, mindestens einen Waschschrift, Metallverbindungs-Schritt, Entwicklungsschritt und/oder Stopschritt.
- 20 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens im Fixierschritt eingesetzt wird und insbesondere in einer Fixierlösung enthalten ist
- 25 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens in mindestens teilweise alkoholischer Lösung eingesetzt wird, vorzugsweise als Bestandteil der Fixierlösung, wobei es sich bei dem Alkohol vorzugsweise um Ethanol handelt.
- 30 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß ein Komplexbildner, vorzugsweise EDTA

und/oder EGTA, im Entwicklungsschritt eingesetzt wird, insbesondere in einer Entwicklungslösung enthalten ist.

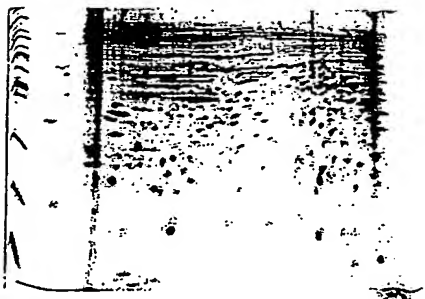
- 5 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Entwicklungslösung ein reduzierendes Agens, bevorzugt aus der Gruppe der Aldehyde, insbesondere Formaldehyd, Natriumcarbonat, den Komplexbildner, und/oder Natriumthiosulfat enthält.
- 10 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Detektion eine Charakterisierung, insbesondere eine massenspektrometrische Untersuchung, der detektierten Moleküle durchgeführt wird.
- 15 22. Kit zur Detektion von Molekülen dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein mindestens bifunktionelles Agens, wobei das Agens mindestens einen hydrophoben Teil und mindestens einen reduzierenden Teil besitzt, vorzugsweise in einer Fixierlösung, enthält.
- 20 23. Kit nach Anspruch 22, weiter gekennzeichnet durch mindestens eines der Merkmale der Ansprüche 2-11, oder durch Zusatz eines Komplexbildners im Entwicklungsschritt.
- 25 24. Kit nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass im Entwicklungsschritt ein Komplexbildner mit den Merkmalen des Anspruch 19 enthalten ist.

Zusammenfassung

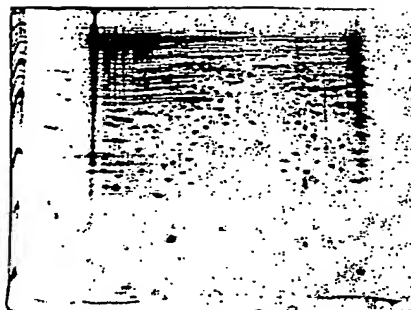
Verfahren zur Detektion von Molekülen, insbesondere von Peptiden,
5 Proteinen, Kohlehydraten, Glycoproteinen, Proteoglykanen und/oder
Nukleinsäuren mittels einer Metallverbindung in Gegenwart mindestens
eines mindestens bifunktionellen Agens.

10

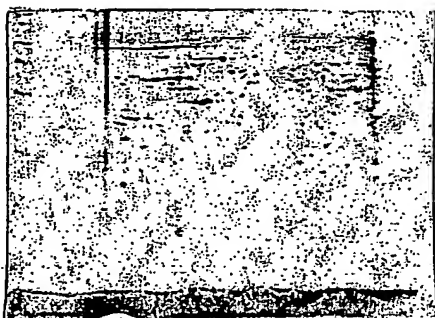
Abbildung 1



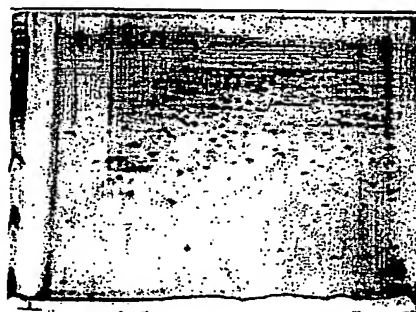
Hochstrasser: 8100 ng



Amersham Biosciences: 8100 ng



SYPRO Ruby: 8100 ng



Neue Silberfärbung : 300 ng

Abbildung 2

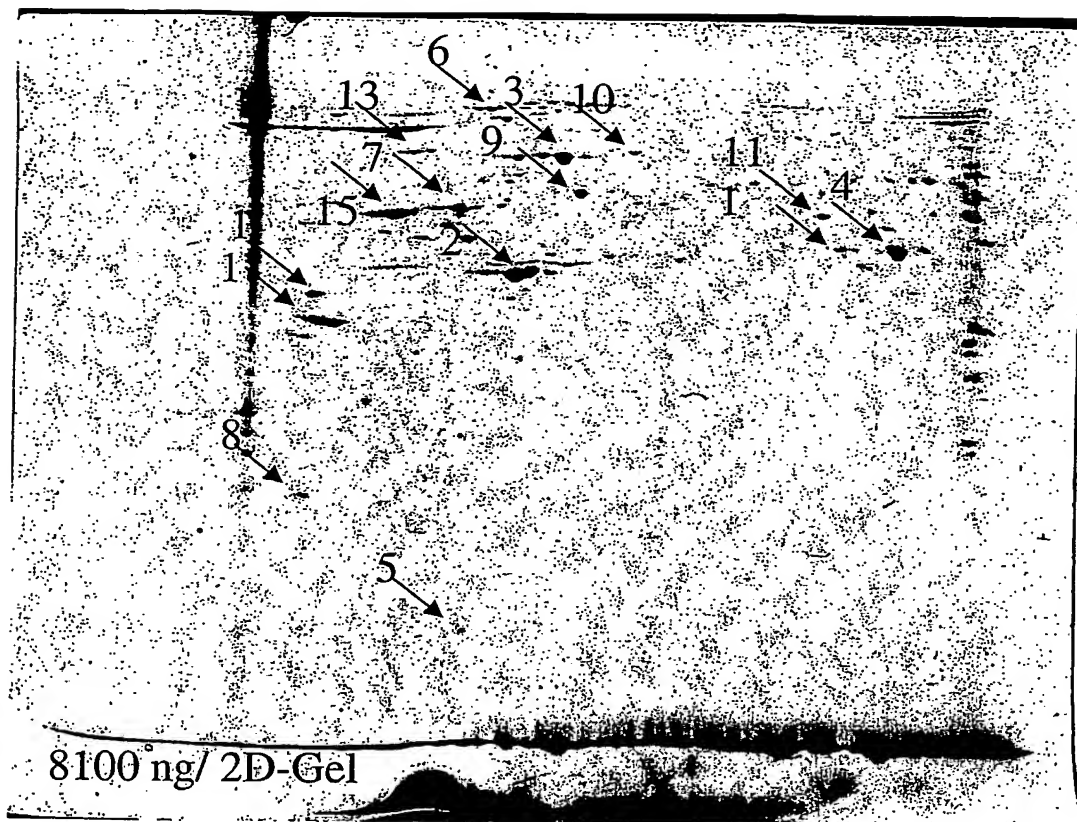


Abbildung 3

Spot-Nr.	Kolloidales Coomassie	Neue Silberfär- bung	Hoch- strasser	Amersham Biosciences
1	11	7	9	4
2	22	22	18	20
3	21	31	13	19
4	35	38	4	9
5	-	-	-	-
6	18	22	3	3
7	24	24	11	11
8	15	8	0	8
9	8	15	3	7
10	14	14	0	3
11	5	11	2	0
12	(~4)	(~4)	(~4)	(~4)
13	9	11	2	9
14	23	25	11	15
15	(~13)	(~13)	(~13)	(~3)
Mittelwert	17,1	19,0	6,3	9,0

Figur 4A

Spot	Name	Peptid Sequenz
1	Nucleophosmin	Peptide nicht geeignet zur Sequenzierung
2	Actin (isoform n.d.)	AVFPSIVGR GYSFTTIAER SYELPDGQVITIGNER VAPEEHFVLLTEAPLNPK
3	Heat shock protein cognate 70	DAGTIAGLNVLRD TVTNNAVTVPAYFNDSQR SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK QTQTFTTYSNDQPGVLIQVYEGER
4	Enolase 1, alpha non neuron	GNPTVEVDLYTAK YITPDQLADLYK AAVPSGASTGIYEALRL
5	no name, keratin contamination	
6	Heat shock protein 110 kDa	VLATAFDFTLQGR AGGIETIANEYSR ELSTTLNADEAVTR EFSITDVVPYPISLR
7	Tubulin alpha 5	EIIDLVLDR AVFVDLEPTVIDEVR VGINYQPPTVVPGGDLAK TIGGGDDSFNTFFSETGACK
8	tumor protein; translationally controlled 1 (21 kDa)	EIADGLCLEVEGK Cys_CAM
9	Chaperonin groEL precursor	TLNDELEIIEGK CEFQDAYVLLSEK AAVEEGIVLGGCCALLR ISSVQSIVPALEIANHR
10	heat shock protein 74 kDa	VQQTVDLFR SDIGEVLVGGMTR Mox LLGQFTLIGIPPAPR NAVITVPAYFNDSQR
11	Chaperonin subunit 2 (beta)	QVLLSAAEAAEVILR EALLSSAVDHGSDEAR
12	Enolase 1, 2, or 3 (alpha, beta, or gamma)	AAVPSGASTGIYEALRL
13	dnak-type molecular chaperone grp78 precursor	ITPSYVAFTPEGER VTHAVTVPAYFNDAQR DNHLLGTFDLTGIPPAPR
14	Lamin receptor 1; p40-3, functional ; p40-8, functional	FAAATGATPIAGR YVDIAIPCNNK FTPGTFTNQIAAFR AIVAIENPADVSVISSR
15	Tubulin (beta 2, 3 oder 5 oder Gemisch)	YLTVAAVPR PGQLNADLR ISEQFTAMFR ISEQFTAMFR Mox
		Mögliche Punktzahl: 4200

Figur 4B

Neue Methode	%	Colloidal Coomassie	%	Spot
				1
NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	2
NH2-GYSFTTT...-COOH	70	NH2-GYSFTTT...-COOH	70	
NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	
	0	NH2-...PVLLTEAPLNPK-COOH	67	
NH2-DAGTIA...-COOH	46	NH2-DAGTIAGLNVLGR-COOH	92	3
NH2-...VVTV...-COOH	22	NH2-TVTVNAVTVVPAYFNDQR-COOH	100	
NH2-SINPDEAVAYGAQAAIISGDK-COOH	100	NH2-SINPDEAVAYGAQAAIISGDK-COOH	100	
	0	NH2-...PGVLIQVYEGER-COOH	50	
NH2-GNPTVEVDLYTAK-COOH	100	NH2-GNPTVEVDLYTAK-COOH	100	4
NH2-YITPDQLADLYK-COOH	100	NH2-YITPDQLADLYK-COOH	100	
NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100	NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100	
				5
NH2-VLATAPD...-COOH	69	NH2-VLATAPD...-COOH	54	6
NH2-...ETIA...-COOH	29	NH2-...ETIA...-COOH	29	
NH2-ELSTTLNADAVTR-COOH	100	NH2-...TTLNA...-COOH	36	
NH2-EFSITDVV...-COOH	87		0	
NH2-BIIDLVLDL-COOH	100	NH2-BIIDLVLDL-COOH	100	7
NH2-AVFVDLEPTVIDEVR-COOH	100	NH2-AVFVDLEPTVIDEVR-COOH	100	
NH2-...YQPPTVV...AK-COOH	50	NH2-...YQPPTVVP...-COOH	44	
NH2-...DSFNTFFSETGAGK -COOH	70	NH2-...DSFNTFFSETGAGK -COOH	70	
NH2-EIADGLCLEV...-COOH	77	NH2-EIADGLCLEVEGK-COOH	100	8
NH2-TLNDELEIIEGMR-COOH	100	NH2-TLNDELEIIEGMR-COOH	100	9
NH2-CEPQDAYVLLSEK -COOH	100	NH2-CEPQDAYVLLSEK -COOH	100	
NH2-...EEGIVLGGGCALLR-COOH	82	NH2-...EEGIVLGGGCALLR-COOH	82	
NH2-...QSIVPALEIA...R-COOH	61	NH2-...SIVPALEIA...R-COOH	56	
NH2-VQQTVDL...-COOH	73	NH2-VQQTVDL...-COOH	73	10
NH2-...VILVG...-COOH Mox	36	NH2-...VILVG...-COOH Mox	36	
	0	NH2-...FTLI...-COOH	27	
NH2-...TV...QR-COOH	27	NH2-...TV...QR-COOH	27	
NH2-QVLLSAAEA...-COOH	60		0	11
NH2-...DHGSD...-COOH	31			
NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	12
NH2-ITPSYVAPT...-COOH	64		0	13
NH2-...VVTVPAYP...-COOH	47			
NH2-...TGIP...-COOH	22			
NH2-FAAATGAT...-COOH	62	NH2-FAAATGAT...-COOH	62	14
NH2-YVDIAIPCNNK -COOH	100	NH2-YVDIAIPCNNK -COOH	100	
NH2-FTPGTFTNQIAAFR -COOH	100	NH2-FTPGTFTNQIAAFR -COOH	100	
NH2-AIVAIENPADVSVISSR-COOH	100	NH2-AIVAIENPADVSVISSR-COOH	100	
NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	15
	0	NH2-PGQLNADLR -COOH	100	
NH2-ISEQPT...R-COOH	70	NH2-ISEQPTAMFR-COOH	100	
NH2-ISEQPTAMFR-COOH	100	NH2-ISEQPTAMFR-COOH	100	
Erreichte Punktzahl:	2799		2819	
Prozent von möglichen Punkten:	67		67	

Figur 4C

Hochstrasser	%	Amersham Biosciences	%	Spot
				1
NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	2
NH2-GYSFTTT...-COOH	70	NH2-GYSFTTT...-COOH	70	
NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	
NH2-...FVLLTEAPLNPK-COOH	67	NH2-...FVLLTEAPLNPK-COOH	67	
NH2-...IA...-COOH	15	NH2-DAGTIAGLNVLN-COOH	92	3
NH2-...VVTV...-COOH	22	NH2-...VVTV...-COOH	22	
	0	NH2-SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK-COOH	100	
	0	NH2-...PGVLIQVY...-COOH	33	
NH2-...VE...-COOH	15	NH2-GNPTVEVDLY...-COOH	77	4
NH2-YITP...-COOH	33	NH2-YITPDQLADLYK-COOH	100	
NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100	NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100	
				5
NH2-...-COOH	0	NH2-...-COOH		6
NH2-...ETI...-COOH	21	NH2-...-COOH		
NH2-...-COOH	0	NH2-...-COOH		
NH2-...TDVV...-COOH	27	NH2-...-COOH		
NH2-EIIDLVLDR-COOH	100	NH2-EIIDLVLDR-COOH	100	7
NH2-AVFDVLEPTVIDEVR-COOH	100	NH2-...VDLEPTVI...-COOH	53	
	0		0	
	0		0	
-----	0		0	8
	0		0	9
	0		0	
NH2-...EGIVLGGCALLR-COOH Cys_CAM	76	NH2-...EGIVLGG...-COOH	41	
	0		0	
	0		0	10
NH2-QVLLSAAEA...-COOH	60			11
NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	12
				13
NH2-FTPGTFTNQIAAFR -COOH	0		0	14
NH2-AIVAIENPADSVISSR-COOH	100		0	
	100	NH2-...AIENP...-COOH	29	
NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	15
NH2-PGQLNADLR -COOH	100	NH2-PGQLNADLR -COOH	100	
NH2-ISEQFT...R-COOH	70	NH2-ISEQFTA...R-COOH	80	
NH2-ISEQF...R-COOH	60	NH2-ISEQF...R-COOH	60	
	1480		1468	
	35		35	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.